

Radioimunoanalýza

Z. Hudáčová¹, K. Bodnár², L. Peterková³, J. Turza⁴, E. Mouková⁵, D. Příbyl⁶

¹Bilingválne gymnázium Milana Hodžu, Sučany, ²Gymnázium Kadaň, ³Wichterlovo gymnázium, Ostrava-Poruba, ⁴Gymnázium Velké Meziříčí, ⁵Gymnázium Jana Keplera, ⁶Gymnázium Milady Horákové

¹zuzka.hudacova@gmail.com, ²krystof.bodnar@seznam.cz, ³lucie.peterkova@volny.cz, ⁴turzajan@email.cz, ⁵elimoukova@seznam.cz, ⁶daniel.pribyl@email.cz

Abstrakt:

Radioimunoanalytické metody slouží k *in vitro* stanovování koncentrací různých látek v tělních tekutinách. Vlastní stanovení vychází z reakce antigenu a protilátky, z nichž jedna je radioaktivně značená. V rámci tohoto miniprojektu bylo provedeno stanovení koncentrace estriolu v neznámém vzorku metodou radioimunoanalýzy (RIA).

1 Úvod

V dnešní době se do popředí dostávají metody využívající radionuklidy při měření koncentrace různých látek v tělních tekutinách či tkáňových extraktech. Imunoradioizotopové metody se vyznačují vysokou citlivostí a specificitou. Vysoká citlivost je dána radiometrickým vyhodnocováním. Vysoká specificita je dána tím, že metoda je založená na reakci látky s protilátkou. Těmito metodami lze určit poměrně jednoduše a při malém množství vzorku (10-100 μL) každou látku, proti které lze připravit odpovídající protilátku. Specificita nemusí být vždy absolutní, což je dáno konkurenčními reakcemi ve zkoumaném vzorku.

Existují dvě varianty metody, RIA (radioimmunoassay) a IRMA (immunoradiometric assay). Princip metody RIA spočívá v tom, že rovnovážná konstanta reakce *látka-protilátka* je stejná jako rovnovážná konstanta *radioaktivně značená látka-protilátka*. Čím vyšší bude koncentrace dané látky, tím menší budou naměřené hodnoty radioaktivity v komponentech obsahujících protilátku. Ačkoliv je možné použít široké spektrum radionuklidů, v praxi se však nejvíce používá ¹²⁵I či ³H. Poločas rozpadu ¹²⁵I je 60 dní a ³H 13 let.

Princip metody IRMA se od metody RIA liší tím, že se používají dvě protilátky, z nichž jedna je značená. Dochází k vytvoření tzv. sendvičového komplexu. Čím vyšší bude koncentrace dané látky ve vzorku, tím vyšší budou naměřené hodnoty radioaktivity.

V rámci tohoto experimentu byla stanovována koncentrace estriolu. Jedná se o ženský pohlavní hormon. Stanovování se používá pro odhad rizika výskytu Downova syndromu v prenatálním screeningu.

2 Materiály a metody

Ke stanovení koncentrací estriolu ve vzorcích C1 a C2 byl použit kit RIA Unconjugated Estriol. V obou případech bylo postupováno podle následujícího postupu. V každém experimentu bylo použito devět zkumavek potažených protilátkou. Do zkumavek označených čísly 0-5 bylo odpipetováno 50 μL kalibrátoru o různé koncentraci estriolu. Do zkumavky

označené jako C2/C1 bylo odpipetováno 50 μL neznámého vzorku a zbylé dvě zkumavky (T1, T2) sloužily pouze jako kontrolní vzorky a obsahovaly jen radioindikátor.

Do každé z těchto zkumavek bylo odpipetováno 300 μL radioindikátoru, zkumavky byly promíchány a inkubovány po dobu 30 minut. Poté byla kapalná fáze odsáta (kromě T1 a T2) a byla změřena aktivita vzorku na scintilačním detektoru.

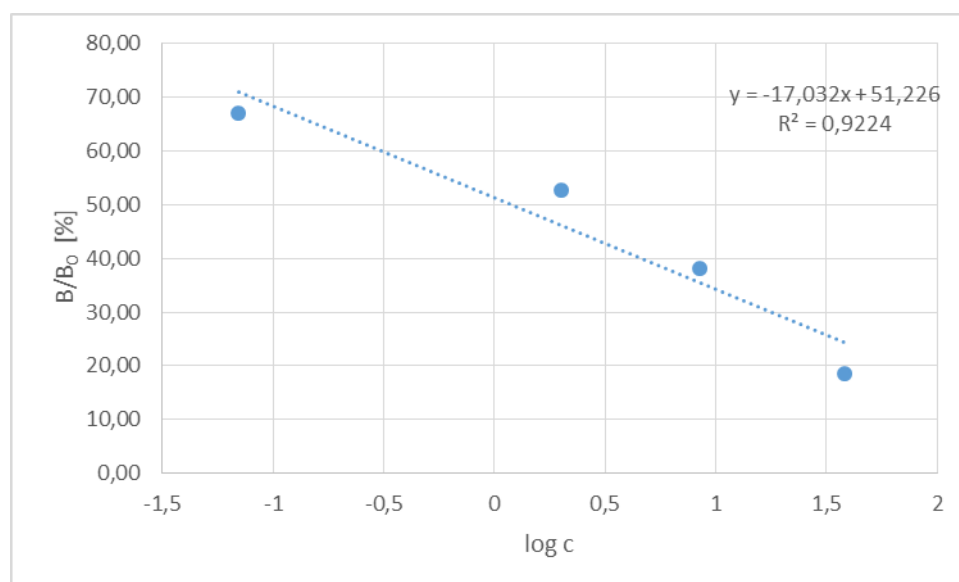
3 Výsledky a diskuse

V tabulkách 1 a 2 jsou shrnuty naměřené hodnoty četnosti impulzů jednotlivých vzorků a pozadí pro obě stanovení.

Stanovení koncentrace ve vzorku C2

Tab. 1: Naměřené hodnoty četnosti impulzů vzorků a pozadí, průměrné hodnoty četnosti impulzů B_p a čisté četnosti impulzů vzorků B

ID	c [ng/mL]	1 [cps]	2 [cps]	3 [cps]	B_p [cps]	B [cps]	B/B_0 [%]
Pozadí	-	21	20	21	21	-	-
0	0	177	175	178	177	156	100,00
1	0,07	128	123	125	125	104	67,09
2	0,50	162	156	161	160	139	89,10
3	2,00	105	102	102	103	82	52,78
4	8,50	80	81	80	80	59	38,25
5	38,0	49	50	50	50	29	18,59
C2	?	151	155	149	152	131	83,97
T1	-	220	225	224	223	202	-
T2	-	224	229	227	227	206	-



Graf 1: Závislost B/B_0 [%] kalibračních vzorků na $\log c$ estriolu

Kalibrační přímka (viz graf 1) byla konstruována jako lineární regrese závislosti B/B_0 (poměr čisté četnosti impulzů kalibrátoru a čisté četnosti kalibrátoru s nulovou koncentrací) na $\log c$,

přičemž byla zjištěna odchylka v případě koncentrace 0,50 ng/mL, která byla pravděpodobně způsobena chybou při pipetování. Z důvodu odlehlosti nebyl bod použit pro sestavení grafu. Pomocí kalibrační přímky byla vypočtena koncentrace v neznámém vzorku C2:

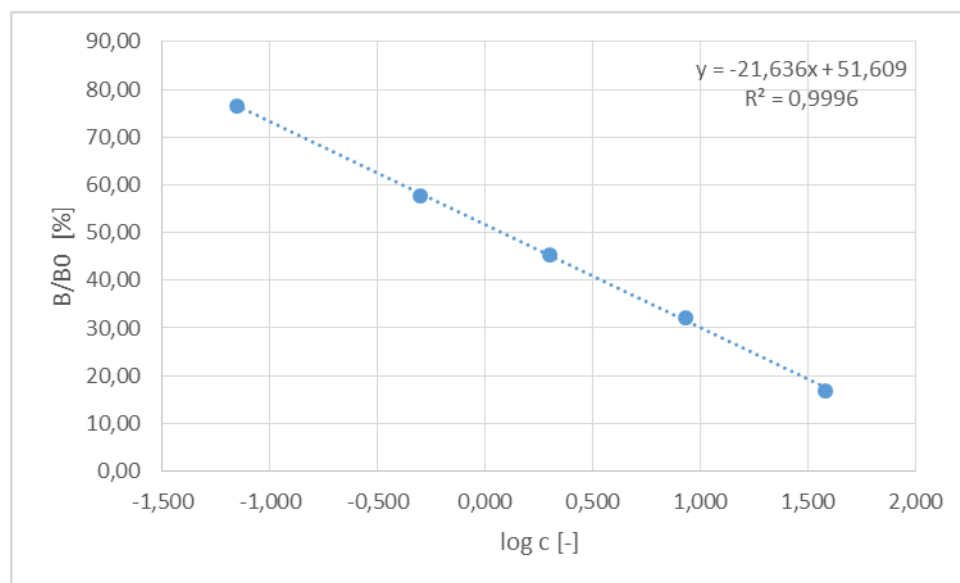
$$\log c = - (83,974 - 51,226) / 17,032 = -1,923$$

$$c = 0,012 \text{ ng/mL}$$

Stanovení koncentrace ve vzorku C1

Tab. 2: Naměřené hodnoty četnosti impulsů vzorků a pozadí, průměrné hodnoty četnosti impulsů B_p a čisté četnosti impulsů vzorků B

ID	c [ng/mL]	1 [cps]	2 [cps]	3 [cps]	B_p [cps]	B [cps]	B/ B_0 [%]
Pozadí	-	21	20	21	21	-	-
0	0	160	158	159	159	138	100,00
1	0,07	127	127	126	127	106	76,57
2	0,50	99	101	102	101	80	57,73
3	2,00	83	85	83	84	63	45,41
4	8,50	64	67	65	65	44	32,13
5	38,0	44	45	44	44	23	16,91
C1	?	102	101	100	101	80	57,97
T1	-	233	227	233	231	210	-
T2	-	225	225	225	225	204	-



Graf 2: Závislost B/ B_0 [%] kalibračních vzorků na log c estriolu

Kalibrační přímka (viz graf 2) byla konstruována jako lineární regrese závislosti B/ B_0 (poměr čisté četnosti impulsů kalibrátoru a čisté četnosti kalibrátoru s nulovou koncentrací) na log c . Pomocí kalibrační přímky byla vypočtena koncentrace v neznámém vzorku C1:

$$\log c = - (57,970 - 51,609) / 21,636 = -0,294$$

$$c = 0,508 \text{ ng/mL}$$

4 Shrnutí

Osvojili jsme si metody radioimunoanalýzy. Byly změřeny kalibrační závislosti a stanoveny koncentrace estriolu pomocí radioimunoanalýzy ve vzorcích C1 a C2. Pro C1 byla naměřena koncentrace 0,508 ng/mL a pro C2 0,012 ng/mL.

Poděkování

Chtěli bychom poděkovat za pomoc a podporu při práci skvělým konzultantům Ing. Kateřině Fialové, Ing. Lukáši Ondrákovi, Mgr. Kláře Belešové, Ing. Ekaterině Kuklevě a RNDr. Martinu Vlkovi, Ph.D. Dále bychom chtěli poděkovat organizačnímu výboru Týdne vědy 2018 za průběh celé akce.

Reference:

[1] MAJER, V.: *Základy jaderné chemie*, SNTL, 1981

[2] SPC kitu RIA Unconjugated Estriol

[3] SAHA, G. B.: *Physics and radiobiology of nuclear medicine*, Springer Science and Business Media, 2012